STED 나노스코피의 발전과 응용

DOI: 10.3938/PhiT.21.020

한 규 영

Advances in STED Nanoscopy

Kyu Young HAN

Fluorescence microscopy is one of the most powerful tools in science and allows noninvasive characterization of a sample with high sensitivity and specificity. For a long time, however, details smaller than half the wavelength of light (~ 200 nm) could not be resolved by using a conventional light microscope. Recently, to break diffraction barrier, researchers have demonstrated various super-resolution approaches, such as stimulated emission depletion (STED) microscopy, to a resolution of better than 20 nm. This review describes the principles and the features of STED microscopy, and its current advanced applications to physics, chemistry, material science and biology.

서론

광학현미경(optical microscopy)은 약 400년 이전부터 사용되어 온 매우 고전적인 관찰 및 분석 도구이지만, 그 형태와 기능을 현재까지도 유지한 채 많은 분야에서 활발하게 이용되고 있다. 가시광선 영역의 광원을 이용해 살아 있는 세포 같이 투명한 샘플의 안쪽 깊숙한 곳까지 볼 수 있다는 점은 광학현미경만의 고유한 특징이라고 할 수 있다. 게다가 형광 물질을 세포 내 작은 기관이나 특정 지역에 표지할 수 있는 방법의 도움으로, 관심 있는 생체분자들의 상호 작용과 위치

저자약력

한규영 박사는 2010년에 서울대학교 화학부에서 박사학위를 받았으며, 현재는 University of Illinois at Urbana-Champaign에서 박사 후 연구원으로 근무하고 있다. 박사학위 기간 중 Max-Planck-Institute에서 STED nanoscopy에 대한 연구를 수행하였다. (kyhan@illinois.edu)

그리고 움직임에 대한 정보들을 고감도로 얻을 수 있게 되어 의학이나 생물 분야 등에서는 가장 중요한 방법으로 자리매김하였다.

20세기 중반 이후 눈부시게 발전한 광학 렌즈와 레이저 그리고 광검지기(photo-detector) 기술에도 불구하고, 광학현미경을 이용해 빛의 회절한계(diffraction-limit) 이상의 공간분해능(spatial resolution)을 얻는 것은 오랫동안 물리적으로 불가능하다고 인식되어 왔다.^[1,2] (현재 일반적인 광학현미경을 이용한 공간 분해능은 x, y 방향으로는 ~ 200 nm 그리고 z 방향으로는 ~ 500 nm 정도이다.) 하지만 최근에 이러한 한계를 뛰어넘을 수 있는 새로운 개념의 형광 나노스코피(fluorescence nanoscopy)가 등장하여 여러 분야에서 성공적으로 이용되고 있으며, 심지어 상용화 장비들도 어렵지 않게 찾을 수 있게 되었다.

STED(Stimulated emission depletion) microscopy는 일반적인 대물렌즈(objective lens)로 빛을 포커싱(focusing)해 회절한계를 뛰어넘은 첫 번째 형광 나노스코피 방법으로,^[3] 약 6 nm의 최고 공간분해능을 기록하고 있다.^[4] 이 기술은 1994년 독일의 Stefan W. Hell 교수에 의해 처음으로 아이디어가 제안된 이후 발전을 거듭하여 현재 가장 일반적이고 유연하면서 강력한 형광 나노스코피로 인정받고 있다.

기본 원리^[5]

형광체(fluorophore)가 자극방출(stimulated emission) 현상을 겪게 되면 크게 두 가지 결과를 초래하게 된다. 우선 (i)

REFERENCES

- [1] E. Abbe, Arch. Mikr. Anat. **9**, 413 (1873).
- [2] S. W. Hell, Science **316**, 1153 (2007).
- [3] S. W. Hell and J. Wichmann, Opt. Lett. **19**, 780 (1994).
- [4] E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine, C. Eggeling and S. W. Hell, Nature Photon. **3**, 144 (2009).
- [5] K. Y. Han, Optical Science and Technology **15**, 31 (2011).

Fig. 1. Principles of STED imaging. Focal intensity distributions of excitation (left) and STED beams (middle). An effective focal spot with sub-diffraction size (right) is generated by overlaying the excitation and STED beams.

Fig. 2. STED microscopy with nanometric resolution. Imaging densely packed color centers in diamond. The effective focal spot size is about 16–18 nm and the localization accuracy is 1–2 Å.

Diffraction limited resolution	Diffraction unlimited resolution by STED nanoscopy
$\Delta r \sim \frac{\lambda}{2NA}$	$\Delta r \sim \frac{\lambda}{2NA \sqrt{1+I/I_s}}$

Fig. 3. A new resolution scaling law by STED nanoscopy (right) and Abbe's diffraction limit (left). λ : wavelength of light, NA : numerical aperture, I : intensity of STED light, I_s : characteristic STED intensity.

들뜬 상태(excited state)에 있던 형광체는 기저 상태(ground state)로 다시 돌아가게 되고, (ii) 들뜬 상태와 기저 상태의 에너지 레벨 차이에 해당하는 빛이 복제되어 나오게 된다. 대부분의 광학분야에서는 후자에서처럼 자극방출현상에서 복제된 photon에 초점을 두어 이를 레이저의 기본원리로 이용하지만, STED 나노스코피는 형광체 혹은 매질(medium)에서 일어나는 전자의 현상에 주목한다. 그림 1에서 보듯이 일반적인 가우시안(Gaussian) 형태의 포컬 스팟(focal spot)으로 형광체를 여기(excitation)시킨 후, 도넛 형태의 포컬 스팟을 공간과 시간적으로 첫 번째 빔과 중첩시키면 중심부를 제외한 다른 곳에서 나오는 형광을 강하게 억제하여 서브 회절크기의 포컬 스팟을 얻을 수 있게 되는 것이다.^[6] 이러한 원리를 실험적으로 구현하게 되면 그림 2에서 보듯이 기존의 공

초점(confocal) 현미경 이미지와는 현저히 다른 고분해능의 형광 이미지를 얻을 수 있게 된다. 이러한 STED 나노스코피의 분해능은 조사(illumination)한 STED빔 세기(intensity)의 제곱근에 반비례하며,^[7] Abbe's limit이라고 알려진 공간분해능에 이 새로운 항이 추가되어, 이론적으로는 분자 수준의 분해능까지 다다를 수 있다.^[4,8] (그림 3)

기본적인 STED 이미징

비록 새로운 형광 나노스코피로 고분해능을 얻을 수 있다고 하더라도 이 기술이 기존 형광 이미징 기술의 장점을 지니고 있지 않다면 그 효용성이 크게 떨어질 것이다. 일반적인 형광 현미경의 특징은 크게 세 가지를 꼽을 수 있는데, 3차원과 multi-color 그리고 video-rate 이미징을 할 수 있다는 것이 바로 그것이다. STED 나노스코피는 지금까지 알려진 여러 형광 나노스코피 중에 위 세 가지를 모두 구현할 수 있는 거의 유일한 방법이다.

우선 3차원 STED 이미징의 경우, x 와 y 방향뿐만 아니라 z 방향으로도 강하게 형광을 억제할 수 있는 포컬 스팟을 만들어 ~ 120 nm의 z 방향 공간분해능을 이루거나,^[9,10] 두 개의 마주보는 대물렌즈를 이용해 ~ 45 nm까지 공간분해능을 향상시킬 수 있다.^[4] 이러한 3차원 STED 이미징 기술을 이용해 나노 콜로이드, 다이아몬드 컬러센터(그림 4) 그리고 블록 공중합체(block copolymer, 그림 5)^[11] 등의 3차원 구조와 정렬 상태를 확인할 수 있을 뿐만 아니라,^[9-11] 세포 내 소기관인 미토콘드리아의 내부 구조 및 단백질의 분포를 관찰할 수 있다.^[12]

생물학에서 두 개 혹은 그 이상의 여러 분자들이 어디에서 그리고 어떻게 상호관계를 맺는지를 밝히는 것은 매우 중요하다. 이를 위해서는 관찰하고자 하는 대상에 서로 다른 분광학적 성질을 지니는 형광체를 표지하여 이들을 구별해서 이

REFERENCES

- [6] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner and S. W. Hell, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **97**, 8206 (2000).
- [7] B. Harke, J. Keller, C. K. Ullal, V. Westphal, A. Schoenle and S. W. Hell, Opt. Express **16**, 4154 (2008).
- [8] S. W. Hell, Nat. Biotechnol. **21**, 1347 (2003).
- [9] B. Harke, C. K. Ullal, J. Keller and S. W. Hell, Nano Lett. **8**, 1309 (2008).
- [10] K. Y. Han, K. I. Willig, E. Rittweger, F. Jelezko, C. Eggeling and S. W. Hell, Nano Lett. **9**, 3323 (2009).
- [11] C. K. Ullal, R. Schmidt, S. W. Hell and A. Egner, Nano Lett. **9**, 2497 (2009).
- [12] R. Schmidt, C. A. Wurm, S. Jakobs, J. Engelhardt, A. Egner and S. W. Hell, Nat. Methods **5**, 539 (2008).

Fig. 4. Three-dimensional (3D) confocal and STED imaging on color centers embedded in bulk diamond. Insets: focal spots of excitation (left) and 3D-STED beam (right).

Fig. 5. Block Copolymer nanostructures visualized by 3D-STED nanoscopy. The length of short edge is 0.6 μm (left) and 1 μm (right).

Fig. 6. Multi-color STED nanoscopy by different fluorescence emission spectrum and fluorescence lifetime. Blue: lamin, green: tubulin, red: clathrin.

미정해야 한다. STED 나노스코피의 경우에는 서로 다른 형광 방출이나 형광 수명(lifetime) 혹은 광변색(photochromism) 등을 이용하여 두 가지 이상의 컴포넌트를 고분해능으로 이미징하는 것이 가능함을 보여주었다.^[13-15](그림 6)

STED 나노스코피의 가장 큰 장점은 실시간(real-time)으로 형광체의 움직임을 관찰할 수 있다는 것이다. 예를 들면, 살아 있는 신경세포에서 시냅스 소포체(synapse vesicle)의 움직임을 video-rate에 가까운 28 frame/sec의 속도로 이미징하거나(그림 7), 신경 돌기(spine)나 액틴(actin)의 움직임과 같은 생리학적 현상을 나노 스케일에서 연구할 수 있는 것이

Fig. 7. Tracking synapse vesicles in living neuron cell by STED nanoscopy. Arrows display movements of the vesicles in successive images.

Fig. 8. Actin dynamics in living brain cell. STED nanoscopy enables to visualize rapid reorganization of actin distribution inside dendritic spines.

다(그림 8).^[16-18] 뿐만 아니라 그림 9에서 보듯이 나노 콜로이드 결정의 자기조립(self-assembly) 같은 현상을 서브 회절 분해능과 200 frame/sec의 빠른 속도로 관찰 가능하여 그 응용 범위가 광범위함을 보여주었다.^[19]

발전된 STED 나노스코피

STED 나노스코피는 앞에서 언급했던 기본적인 이미징뿐만

REFERENCES

- [13] G. Donnert, J. Keller, C. A. Wurm, S. O. Rizzoli, V. Westphal, A. Schonle, R. Jahn, S. Jakobs, C. Eggeling and S. W. Hell, *Biophys. J.* **92**, L67 (2007).
- [14] J. Bückers, D. Wildanger, G. Vicidomini, L. Kastrup and S. W. Hell, *Opt. Express* **19**, 3130 (2011).
- [15] K. I. Willig, A. C. Stiel, T. Brakemann, S. Jakobs and S. W. Hell, *Nano Lett.* **11**, 3970 (2011).
- [16] V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn and S. W. Hell, *Science* **320**, 246 (2008).
- [17] U. V. Nagerl, K. I. Willig, B. Hein, S. W. Hell and T. Bonhoeffer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **105**, 18982 (2008).
- [18] N. T. Urban, K. I. Willig, S. W. Hell and U. V. Nagerl, *Biophys. J.* **101**, 1277 (2011).
- [19] M. A. Lauterbach, C. K. Ullal, V. Westphal and S. W. Hell, *Langmuir* **26**, 14400 (2010).

Fig. 9. Formation of a colloidal crystal visualized by fast STED nano-scopy. The size of particle is 200 nm.

Fig. 10. STED microscopy in living mouse brain. The temporal dynamics of dendritic and axonal structure can be visualized with a fourfold improved resolution. Scale bars, 1 μ m.

아니라 기존의 고급 형광 이미징 및 분광학 기술들과 결합하여 눈부시게 발전하고 있다. 예를 들면 형광 수명 이미징 기술을 응용하거나,^[20] 3차원 나노 리소그래피(lithography)에 이용되기도 한다.^[21] 여기서는 가장 대표적인 네 가지 응용분야를 소개하도록 하겠다.

1. In vivo와 two-photon STED 이미징

살아 있는 세포와 조직 더 나아가 동물에서 형광 나노스코피를 이용하기 위해서는 빠른 이미징 속도뿐만 아니라, 조사하는 빛의 투과성이 매우 중요하다. 이를 위해서 STED 나노스코피는 기존의 빠른 스캐닝 방법과 two-photon 여기 방법을 사용하여 표면에서 100 μ m 아래에 위치한 신경 세포의 움직임뿐만 아니라 살아 있는 쥐의 뇌에서 신경 돌기의 분포 및 움직임을 관찰하였다(그림 10).^[22,23] 이러한 강력한 형광 나노스코피 방법은 in vivo에서 뇌의 발달과정과 뇌 관련 질병 등에 대한 연구에 큰 도움을 줄 것으로 예상하고 있다.^[23]

2. STED-FCS를 이용한 나노도메인 연구

STED 나노스코피와 제일 먼저 결합한 분광학 기술은 바로 FCS(fluorescence correlation spectroscopy)이다. FCS는 주어진 포컬 부피를 지나가는 형광 분자들에서 나오는 형광

Fig. 11. Novel nanoscopic techniques for the study of nanodomains. STED nanoscopy is able to discern between freely diffusing molecules (red) and hindered ones (blue) during their passage through the sub-diffraction spot.

신호가 평균값과 어떤 타임 스케일에서 얼마나 다른지의 여부를 통해, 형광체가 표지된 분자의 확산(diffusion) 속도와 형광체 자체의 분광학적 특징 등을 고감도로 측정할 수 있는 방법이다. 생물학에서는 주로 생분자들의 움직임성(mobility)과 결합 여부를 정량적으로 확인하는 데 많이 사용되고 있다. 예를 들어 회절 한계보다 작은 도메인이 2차원 막(membrane) 내부에 있다고 가정해보자. 막 내부를 움직이는 분자들마다 이 도메인과 상호작용하는 정도가 다르기 때문에 자유롭게 움직일 수도 있고 혹은 도메인에 포획될 수도 있을 것이다. 하지만 탐지하는 영역이 도메인보다 매우 크다면 이러한 움직임들이 평균화되어 이를 구별할 수 없게 된다. 그림 11에서 보듯이 STED-FCS는 작은 포컬 부피를 이용하여 살아 있는 세포의 막에서 일어나는 다양한 지질(lipid)들의 동력학을 처음으로 명확하게 규명해 보여 큰 반향을 불러 일으켰다.^[24]

3. 서브회절 범위에서의 antibunching과 ESR

회절 한계 범위, 즉 200 nm 이내에 있는 여러 개의 형광체가 빛을 내는 경우 일반적인 광학적인 방법으로는 이들의 양상을 평균된 물리적 정보를 얻을 수밖에 없다. 하지만

REFERENCES

- [20] G. Vicidomini, G. Moneron, K. Y. Han, V. Westphal, H. Ta, M. Reuss, J. Engelhardt, C. Eggeling and S. W. Hell, *Nat. Methods* **8**, 571 (2011).
- [21] J. Fischer and W. Wegener, *Adv. Mater.* **24**, OP65 (2012).
- [22] J. B. Ding, K. T. Takasaki and B. L. Sabatini, *Neuron* **63**, 429 (2009).
- [23] S. Berning, K. I. Willig, H. Steffens, P. Dibaj and S. W. Hell, *Science* **335**, 551 (2012).
- [24] C. Eggeling, C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V. N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schonle and S. W. Hell, *Nature* **457**, 1159 (2009).

Fig. 12. A tunable focal spot of STED microscopy can selectively probe antibunching signals from individual quantum objects.

Fig. 13. Single molecule STED images of immobilized single-stranded DNA labeled with ATTO647N.

STED 나노스코피로 매우 작은 영역에서 나오는 형광 정보만 획득한다면 각각의 방사체(emitter)에 대한 양자 정보를 얻을 수 있게 된다. 예를 들어 가깝게 위치한 두 형광체 중 오직 하나에 대해서만 STED 나노스코피를 이용해 antibunching 신호를 감지하면 그 방사체가 하나인지 혹은 그 이상인지를 밝힐 수 있다(그림 12).^[10] 또한 광학적으로 탐지가 가능한 자기 공명(optical detection of magnetic resonance)을 이용하여 STED 나노스코피는 회절 한계에 구애 받지 않고 근

접한 형광체들의 스핀 상태와 자기장에 대한 정보까지 얻을 수 있다는 것을 보여주었다.^[25]

4. Single molecule STED

STED 나노스코피는 형광으로 표지된 분자의 개수에 제약이 없다는 특징을 가지고 있다. 즉 양상블과 단분자(single molecule) 형광체에 모두 적용이 가능하다는 것이다. 형광체의 광표백(photobleaching)과 깜박임(blinking)을 억제할 수 있는 화합물들의 등장으로 STED 나노스코피를 이용해 단분자들을 매우 높은 분해능으로 오랫동안 관찰할 수 있게 되었다(그림 13).^[26] 게다가 STED 나노스코피가 제공하는 매우 작은 부피는 단분자 연구를 할 수 있는 농도의 한계를 끌어올려 단분자 생물학의 난제로 알려진 고농도에서의 연구를 가능케 할 것으로 전망하고 있다.

맺음말

오랜 세월 동안 회절한계로 인해 200 nm의 분해능밖에 가지지 못했던 광학현미경 기술은 STED 현미경을 비롯한 다양한 형광 나노스코피의 등장으로 그 벽을 넘게 되었다. 비록 STED 나노스코피가 가장 먼저 구현된 기술이긴 하지만 장비 구현의 어려움으로 많은 사람들의 접근이 어렵다는 단점을 지니고 있다는 것은 사실이다. 하지만 높은 고분해능을 유지하면서도 다채로운 형광 기술들과 자유롭게 결합하여 물리, 화학 그리고 생물 분야에서 사용되고 있다는 점은 STED 나노스코피의 큰 매력이라고 할 수 있다. 기술적으로 완성이 된 STED 나노스코피는 앞서 언급한 분야 이외에도 꾸준히 새로운 응용분야를 현재 모색하고 있는 중이어서 앞으로 어떤 연구가 진행이 될지 더욱 궁금하다.

REFERENCES

- [25] D. Wildanger, J. R. Maze and S. W. Hell, Phys. Rev. Lett. **107** (2011).
- [26] R. Kasper, B. Harke, C. Forthmann, P. Tinnefeld, S. W. Hell and M. Sauer, Small **6**, 1379 (2010).